Vergleich biologischer Methoden zum Nachweis von Hemmstoffen in Schweinenieren

Horst Piening

1962

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. L. Kotter

VERGLEICH BIOLOGISCHER METHODEN ZUM NACHWEIS VON HEMMSTOFFEN IN SCHWEINENIEREN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Horst Piening

Tierarzt

Neumünster / Holstein

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. K. Ullrich
Referent: Prof. Dr. L. Kotter
Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1962

UNI-Druck München 13 Amalienstraße 85

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. SCHRIFTTUM	2
I. Geschichtliches	2
II. Gehalt des Tierkörpers an Antibiotika nach therapeutischer Anwendung und Beeinflussung der bakteriologischen Fleischuntersuchung	2
III. Gehalt des Tierkörpers an Antibiotika nach nutritiver Anwendung und etwaige Beeinflussung der bakteriologischen Fleischuntersuchung	7
IV. Antibiotika in der Lebensmittelkonservierung	9
V. Biologische Testmethoden zur Ermittlung von Hemmstoffen	10
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
I. Methodik	13
1. Diffusionstest mit dem Nährboden nach van der Mijll Dekker und Mossel	13
2. Agardiffusionstest	16
3. TTC-Test	16
4. Katalasetest	18
II. Vorversuche	20
1. Ermittlung der Eigenhemmung von antibiotikafreien Nieren mittels Katalasetest und TTC-Test	20
2. Nachweis verschiedener Antibiotika, die zerkleinerten Nieren zugesetzt wurden	22
a) Nachweis von Chloramphenicol, Streptomycin und Aureomycin	23
b) Nachweis von Penicillin	23
c) Besprechung der Ergebnisse	29

Seite

III. Hauptversuche 29
1. Anwendung der Tests bei Nieren von Schweinen, die mit bekannten Mengen eines Antibiotikums behandelt worden waren 29
a) Versuchsanordnung 29
b) Untersuchungsergebnisse 30
c) Besprechung der Ergebnisse 33
2. Anwendung der Tests bei Nieren von Tieren, bei denen eine bakteriologische Fleischuntersuchung stattfand 33

D. DISKUSSION 35

E. ZUSAMMENFASSUNG 41

F. LITERATURVERZEICHNIS 42

LEBENSLAUF

A. EINLEITUNG

Mit der Verabreichung von Antibiotika an Nutztiere sind nicht nur unbestrittene Erfolge verbunden, sondern auch der Vorwurf, daß Lebensmittel, die von so behandelten Tieren stammen, Antibiotikamengen enthalten können, die für die menschliche Gesundheit bedenklich sind. Zu diesen Nahrungsmitteln gehören insbesondere Fleisch und Produkte jener Schlachttiere, die infolge einer Krankheit oft noch kurz vor der Schlachtung behandelt worden sind.

Abgesehen von Hinweisen auf eine mögliche Schädigung des Verbrauchers durch die mit Lebensmitteln aufgenommenen Antibiotika wurde auch mehrfach die Frage gestellt, ob nicht die bakteriologische Untersuchung des Fleisches von solchen Schlachttieren beeinträchtigt ist, denen vor der Schlachtung therapeutische oder nutritive Mengen an Antibiotika verabreicht worden waren, weil das Keimwachstum verhindert oder unterdrückt sein könnte. Schließlich wurde auch von einer Verarbeitung solchen Fleisches zu rohen Dauerwaren abgeraten, da die Pökelflora im Wachstum gestört würde.

Man bemüht sich deshalb schon seit Jahren um Methoden, mit deren Hilfe Antibiotika im Fleisch geschlachteter Tiere in kürzester Zeit und ohne großen Materialaufwand feststellbar sind.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, vier empfohlene Hemmstofftests auf ihre Eignung zum Nachweis von Antibiotika in Nieren von Schlachtschweinen vergleichend zu prüfen.

B. SCHRIFTTUM

I. Geschichtliches

Auf der 7. Nobelpreisträgertagung in Lindau im Juli 1957 führte Müller (54) in seinem Vortrag über "Antibiotika in der Landwirtschaft" aus, daß man seit 1942 rund 3500 Antibiotika entdeckt habe, jedoch nur eine geringe Anzahl davon in Medizin, Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie angewandt werde. Das medizinische "Zeitalter der Antibiotika" habe erst 1944 mit der Verwendung des Penicillins begonnen, das zwar schon 1929 von Fleming (24, 66) entdeckt worden ist, dessen Strukturaufklärung und Herstellung man aber erst ab 1940 weiter verfolgt habe.

1946 wurde das Streptomycin gefunden (66, 76), 1948 Chloromycetin, Aureomycin und später Terramycin (66). Die genannten Antibiotika sind heute aus der Therapie des Arztes nicht mehr fortzudenken.

Antibiotika sind alle natürlichen Stoffe, die, von lebenden Organismen produziert, andere Organismen in ihrer Entwicklung zu hemmen oder abzutöten vermögen. Wenn nur eine kleine Anzahl von Antibiotika medizinische Bedeutung erlangt hat, so liegt das darin, daß die meisten im menschlichen bzw. tierischen Organismus entweder zu wenig wirksam oder zu giftig sind oder bisher erst ungenügend untersucht worden sind (66).

Man darf annehmen, daß noch viele Antibiotika unentdeckt sind, zumal Pflanzen und Tiere sowie der Mensch über natürliche Antibiotika, sogenannte "Inhibine", verfügen, die die Fähigkeit haben, das Wachstum und die Vermehrung fremder Zellen, insbesondere von Mikroben, im oder an der Oberfläche des Organismus zu hemmen (7).

II. Gehalt des Tierkörpers an Antibiotika nach therapeutischer Anwendung und Beeinflussung der bakteriologischen Fleischuntersuchung

In die tierärztliche Therapie haben vor allem Penicillin (24), Streptomycin (76), Chloromycetin (79) und die Tetracycline Aureomycin, Achromycin sowie Terramycin (74) Eingang gefunden. Letztere werden

wegen ihrer Wirksamkeit gegenüber einer großen Anzahl von Erregern auch als "Breitspektrumantibiotika" bezeichnet (75) im Gegensatz z. B. zum Penicillin, das praktisch nur gegen grampositive Keime wirksam ist.

Nachfolgend soll das Schrifttum berücksichtigt werden, das sich mit dem Verbleib der Antibiotika im Organismus, ihrer Einwirkungsdauer und Ausscheidung und ihrem Einfluß auf das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung befaßt.

Penicillin wird in der Therapie nur parenteral verabreicht, da es durch die Magensäure schnell zerstört würde. Nach Schermer (64) ist für die Sicherung eines therapeutisch wirksamen Blutspiegels die Art der Injektion des Penicillins ohne Bedeutung. Bei Injektion wässriger Lösungen erfolgt gute und rasche Verteilung in sämtlichen Geweben des Körpers, aber auch sehr schnelle Ausscheidung (72); der voll wirksame Blutspiegel ist nur für 3 - 4 Std. aufrechtzuerhalten (14, 45, 64); als unterste Grenze der therapeutischen Penicillin-Blutserum-Konzentration würden dabei 0,03 E/ml Serum angenommen (14, 64). Länger anhaltende Blutspiegel werden durch Procain-Penicillin-Injektionen erreicht, da dieses schwerer zu resorbieren ist. Hier wurden je nach Dosierung 24 - 36 Std. anhaltende Blutspiegelwerte gemessen (14, 45, 59, 64).

Die Ausscheidung des Penicillins erfolgt zu etwa 80% durch den Urin; die Inaktivierung im Serum beträgt, je nach Verweildauer, ca. 8 - 10% (34). Es werden allerdings in den Organen und Gewebsflüssigkeiten nur 40 - 50% der verabreichten Dosis wiedergefunden. Bisher war noch nicht zu klären, in welcher Form und wo die restlichen 50 - 60% Penicillin im Körper verbleiben.

Um mit Streptomycin einen therapeutischen Effekt zu erzielen, muß es beim Rind in einer Konzentration von 20 µg/ml Serum vorhanden sein, die bei einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht erreicht wird. Je nach Verwendung einer 33%igen oder einer 50%igen Lösung werden beim Rind Blutspiegelwerte für 48 - 66 Std. erhalten, beim Pferd allerdings nur zwischen 22 und 28 Std. (17).

Für Chloramphenicol stellt English (8) in Untersuchungen der Urin- und Serumspiegel von Pferden fest, daß bei oraler Verabreichung

viel schnellere Ausscheidung erfolgt als bei parenteraler. Nach oraler Verabreichung konnten Chloramphenicol-Blutspiegelwerte nicht länger als bis zu 4 Std. nach der Applikation ermittelt werden. Wirksame Blutspiegelwerte können nur erreicht werden bei einer Dosis, die über 15 mg/kg Körpergewicht liegt. 5 Std. nach der Injektion konnten keine Blutspiegelkonzentrationen im therapeutischen Bereich mehr nachgewiesen werden; im Urin allerdings fanden sich noch nach 24 Std. positive Werte.

Für Tetracycline (Aureomycin und Terramycin) wird ein Blutspiegel von 0,5 - 1,0 p.p.m. als unterste Grenze der therapeutischen Wirksamkeit angesehen (75). Bei einer Aureomycindosierung von 5 mg/kg Körpergewicht wurden bei Pferd und Rind nach intravenöser Injektion wirksame Blutspiegel für 24 Std. erreicht, bei 10 mg/kg Körpergewicht beim Pferd für 35 Std. und beim Rind für 40 Std. (15, 16).

Maier (48) ermittelte beim Schwein nach peroraler Verabreichung von 5 bzw. 20 mg Aureomycin/kg Körpergewicht einen wirksamen Spiegel nach 11,5 bzw. 18,5 Std.

Mit Terramycin konnte beim Rind nach intramuskulärer Injektion von 5 mg/kg Körpergewicht 20 Std., nach Verabreichung der doppelten Menge 48 Std. ein wirksamer Spiegel erreicht werden (16).

Die restlose Klärung aller einschlägigen Fragen, wie z. B. die der partiellen Inaktivierung im Körper, war bisher noch nicht möglich.

Allgemein wurde festgestellt, daß Höhe und Dauer des Blutspiegels, d. h. die Antibiotikamenge pro ml Blutserum, von der Applikationsart, von der Menge des applizierten Antibiotikums und von der Häufigkeit der Applikation in einer bestimmten Zeit abhängig sind.

Die Frage einer möglichen Keimresistenz wurde insbesondere von Jahn (28), aber auch von anderen Autoren geprüft (55, 58, 62).

Von verschiedenen Forschern ist auch die Verteilung der Antibiotika im Organismus und ihre Konzentration in den Organen nach therapeutischen (59, 74) und nutritiven Gaben ermittelt worden (9, 49), wobei stets das Verhältnis zur Konzentration im Blut (= 1) angegeben wurde.

So beträgt nach Herrel und Heilmann (22) die Aureomycinkonzentration im Urin das 15fache, in der Galle das 10fache, in der Leber das

2fache und in Milz und Niere das 4fache des Blutserums.

Deatherage (5) hat bei Rindern, denen vor der Schlachtung Antibiotika injiziert worden waren, beobachtet, daß diese in Leber und Niere gespeichert werden. Konzentrationen wurden nicht genannt, jedoch die Genußuntauglichkeit dieser Organe gefordert.

Torsten (71) hat die prozentuale Verteilung von Streptomycin und Tetracyclin nach intravenöser Injektion im Mäuseversuch ermittelt: Streptomycin erreichte den höchsten Gehalt in den Nieren, Tetracyclin in Niere und Leber.

Meyn, Kalich und Merkenschlager (49) fanden in Versuchen an Kälbern die höchste Aureomycinkonzentration nach verschiedenartiger Applikation in Niere und Leber.

English (8) stellte bei Pferden 6mal höheren Chloromycetingehalt in der Niere wie im Serum fest.

Wegen ihres relativ hohen Antibiotikaspiegels bietet sich die Niere besonders an für den Antibiotikanachweis bei Schlachttieren. Ihr hoher Antibiotikagehalt kann damit erklärt werden, daß die Antibiotika hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden und hierbei im Nierengewebe angereichert werden (66). Außerdem besitzt die Niere keine Eigenhemmung, wie es z. B. bei der Galle der Fall ist, die deshalb für den Test nicht geeignet ist, obwohl sie noch höhere Antibiotikakonzentrationen aufweisen würde. Schließlich besitzt die Niere nur geringen Wert, so daß sie auch aus diesem Grunde anderen Organen vorzuziehen ist.

Wenn therapeutische - und teilweise auch hohe nutritive - Dosen von Antibiotika auf spezielle Erreger im lebenden Organismus bakteriostatisch oder sogar baktericid wirken, so liegt auch die Annahme nahe, daß mit diesem Effekt auch im Fleisch von geschlachteten Tieren zu rechnen ist, sofern diese mit Antibiotika behandelt worden sind (3, 23, 32, 40, 41, 46). Dies war für die fleischhygienische Überwachung von Bedeutung, weil bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung etwa doch nicht abgetötete pathogene Keime mit den üblichen Methoden ohne Anreicherungsverfahren und mit der üblichen Bebrütungszeit von 18 Std. bei 37° C nicht nachgewiesen werden können.

Schon 1949 machte Sompolinski (65) auf diese Möglichkeit aufmerksam. Es waren einigen Ferkeln 12 Std. vor der Schlachtung 50 000 E Penicillin verabreicht worden; obwohl der pathologisch-anatomische Befund auf eine septische Erkrankung hindeutete, war der bakteriologische Befund negativ. An infizierten Mäusen wurde dann gezeigt, daß eine Penicillininjektion kurz vor dem Tode einen negativen bakteriologischen Befund verursachen kann.

Vier Jahre später wies Herter (23) auf die Unsicherheit der bakteriologischen Rotlaufdiagnose selbst bei klinisch erkrankten Schweinen hin, wenn diese mit Penicillin behandelt worden waren, weil bei der bakteriologischen Untersuchung keine Keime nachgewiesen werden konnten.

Auch Holz (26), Grau (18) und v. Gils (13) deuten an, daß die Verabreichung therapeutischer Antibiotikadosen an Tiere vor der Schlachtung das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung beeinflussen und in Frage stellen kann.

Gellert (11) behandelte 11 ca. 10 Wochen alte, mit Salmonella Kunzendorf infizierte Läuferschweine per os mit Aureomycin-Supplement, von denen drei zu Beginn der Behandlung verendeten; am 5. Behandlungstag wurden 8 Tiere getötet, bei denen bakteriologisch in Organen und Lymphknoten keine Salmonellen ermittelt werden konnten. Dieser Nachweis gelang dagegen bei den anfangs verwendeten Tieren.

Clarenburg und Kampelmacher (3) haben einen Fall von Milzbrand bei einem Rind beschrieben, das einige Tage lang vor der Schlachtung mit jeweils 10 ml "Depomycin" (Streptomycin-Penicillin) intravenös behandelt worden war. Bei der bakteriologischen Untersuchung konnten nach 20 und 48 Std. Bebrütung bei 37° C keine Milzbrandbazillen nachgewiesen werden, obwohl klinisch und pathologisch-anatomisch eindeutig Milzbrand vorlag. Erst nach langwierigen Untersuchungen konnte dann der Nachweis der Bazillen erbracht werden. Weiter berichten diese Autoren über 22 kümmemde Kälber, denen Aureomycin per os appliziert worden war und bei denen nach der Schlachtung erst mittels Anreicherungsverfahren Salmonellose festgestellt werden konnte.

Camy (2) berichtet ebenfalls, daß als Folge von Antibiotikaverabreichung an Schlachttiere Wachstumshemmung oder zumindest Wachstumsverzögerung der Keime in flüssigen Nährböden zu beobachten war.

Die Ergebnisse eines Modellversuches an mit Salmonellen infizierten Mäusen übertrugen Kalich und Merkenschlager (31) auf die bakteriologische Fleischuntersuchung bei Kälbern und kamen zu dem Schluß, daß bei der Verabreichung von Aureomycin in therapeutischen Dosen mit Verzögerung bzw. Hemmung des Keimwachstums zu rechnen ist. Meyn und die vorgenannten Autoren (49) konnten dann in einem Versuch mit 30 Kälbern, die mit Aureomycin behandelt und mit Salmonellen infiziert wurden, nachweisen, daß bei therapeutischen Aureomycingaben eine Verzögerung und in einem Falle sogar eine Unterdrückung des Bakterienwachstums bei der bakteriologischen Untersuchung bewirkt wird.

Auch Lochmann (46) vertrat die Auffassung, daß das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung durch zur Zeit des Todes im Organismus befindliches Penicillin gefährdet werden kann.

Nach diesen Befunden war es naheliegend, daß Kotter (40, 41) und später auch Kelch (32) für die bakteriologische Fleischuntersuchung einen biologischen Hemmstofftest empfohlen haben. Kalich und Merkenschlager (31) hatten wenigstens für alle die Fälle, in denen therapeutische Antibiotikagaben vor der Schlachtung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, eine längere Bebrütung vorgeschlagen.

Eine gewisse Einschränkung möglicher Fehlergebnisse bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung ist nun allerdings darin zu sehen, daß mit der Neufassung der AB. A zum FG vom 1. 8. 1960 bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung die Anreicherung zwingend vorgeschrieben wurde, so daß gehemmte Salmonella-Keime mit größerer Sicherheit erfaßt werden können. Außerdem ist neuerdings festgelegt, daß in dem "Antrag auf bakteriologische Fleischuntersuchung" (Anlage AB. A 1) eine eventuelle Antibiotikabehandlung vermerkt wird.

III. Gehalt des Tierkörpers an Antibiotika nach deren nutritiver Anwendung und etwaige Beeinflussung der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Antibiotika, insbesondere Tetracycline, werden als wachstumsaktive Stoffe Futtermitteln beigemischt, so daß sie auch auf diesem Wege in den Tierkörper gelangen können (1, 25, 73). Bei der Geflügelhaltung und

-aufzucht, in der Schweinemast sowie in der Kälberaufzucht werden mit dieser nutritiven Anwendung der Antibiotika Erfolge erzielt. Hierbei wird das Tetracyclin an ein Vehikel gebunden und als Zusatzfuttermittel, auf einen garantierten Antibiotikagehalt eingestellt, standardisiert in den Handel gebracht. So besitzt z. B. das "Aurofac" eine Gehaltsgarantie von 4 g Aureomycin je kg und das "Aurofac-2-A" eine solche von 8 g Aureomycin je kg (73).

Als durchschnittliche nutritiv wirksame Aureomycinmenge wird je Tier und Tag angegeben: Ferkel und Mastschweine 20 - 25 mg, Kälber 40 - 60 mg und Geflügel auf 1 kg Futter 10 - 15 mg Aureomycin (73). Daraus ergibt sich, daß die in der Therapie verwendeten Antibiotikadosen 25- bis 100mal höher liegen als die in der Fütterung gebräuchlichen (73).

Brüggemann und Merkenschlager (1) wiesen darauf hin, daß die üblichen nutritiven Aureomycinmengen bei Schweinen und Kälbern in der Dosis bis zu 1 mg/kg Lebendgewicht zur Ausbildung nachweisbarer Konzentrationen im Gewebe nicht ausreichen.

Auch Untersuchungen von Lorenz (47) ergaben, daß bei einem bis 24 Std. vor der Schlachtung täglich mit 30 mg Aureomycin gefütterten Schwein weder in der Niere noch im Harn Antibiotikareste nachzuweisen sind.

Zu gleichen Ergebnissen kamen auch Meyn, Kalich und Merkenschlager (49) in ihren Versuchen, ebenso auch Foltin (9). Von ihnen wurde auch die Frage, ob Antibiotikabeifütterung auf die bakteriologische Fleischuntersuchung Einfluß nimmt, verneint.

Weiterhin gab der wissenschaftliche Beirat der Bundesärztekammer eine Erklärung ab, in der es heißt, daß "... die neuesten Ergebnisse der medizinischen Forschung gezeigt haben, daß die Verfütterung von Antibiotika bei Tieren, die für die menschliche Ernährung wichtig sind, keine schädliche Wirkung beim Verbraucher hervorruft". Diese Stellungnahme (6) erfolgte auf Bedenken hin, die von verschiedenen Seiten im Hinblick auf die Antibiotikabeifütterung geäußert worden waren. Sie kann jedoch nicht für eine Verfütterung schlechthin gelten, da z. B. die Verabreichung großer Mengen Antibiotika an Schlachttiere einer Konservierung gleichkäme, die aber in dieser Weise nach der Neufassung des Lebensmittelgesetzes (§ 4b) verboten ist.

IV. Antibiotika in der Lebensmittelkonservierung

Nachdem die Antibiotika bei der Bekämpfung pathogener Keime mit Erfolg angewendet wurden, lag ihre Verwendung auch bei der Haltbarmachung von Lebensmitteln nahe.

Auf der Suche nach neuen und besseren Konservierungsmethoden wurden bei verschiedenen Nahrungsmitteln insbesondere Tetracycline als geeignet befunden (21, 68, 77). So hat Tarr (67) schon 1944 über die Anwendung von Antibiotika bei der Frischhaltung von Seefischen berichtet und diese Methode weiter geprüft und entwickelt (68, 69). Von Lerke und Mitarbeitern (44) sowie von Kline und Mitarbeitern (37) wurden Konservierungsversuche durchgeführt, bei denen Fischfilets 5 min in eine 5 p.p.m. aureomycinhaltige Tauchlösung verbracht worden waren und deren Haltbarkeit dadurch gegenüber unbehandelten Kontrollproben um das Eineinhalbfache verlängert werden konnte.

Ein ähnliches Verfahren führte auch bei Geflügel zur Haltbarkeitsverlängerung (39, 78): die Tierkörper werden nach der Schlachtung in aureomycin- oder terramycinhaltige Lösungen getaucht und dann eingefroren. Für den Erfolg dieser Behandlung ist die einwandfreie Beschaffenheit der Hühner Voraussetzung, d.h. Schlachtung und weitere Behandlung des Geflügels müssen unter hygienisch einwandfreien Bedingungen erfolgen, um den Anfangskeimgehalt der Hautoberfläche möglichst niedrig zu halten (29).

In ihren Referaten beim internationalen Symposion in Wien 1956 über die Bedeutung der Antibiotika in Tierernährung und Lebensmittelhygiene gaben White-Stevens (78), Partmann (60), Grau (19) und Kreuzer (43) Überblicke über die Antibiotikaanwendung bei der Lebensmittelkonservierung. Henneberg (20) warnte allerdings vor einer unkontrollierten Anwendung und forderte vor allem einwandfreie Hygiene bei Schlachtung, Bearbeitung und Lagerung von Fleisch und Fleischwaren.

Durch 3 - 5 p.p.m. Aureomycin wird die Frischhaltung von Brühwurst um 50 - 100 % verlängert (80), während die Haltbarkeit von Dosenwürstchen durch Zusatz von 50 p.p.m. Aureomycin zur Lake auf das Doppelte erhöht wird (19).

Selbst die Haltbarkeit ganzer Tierkörper oder Tierkörperviertel konnte erheblich verbessert werden, wenn den Tieren unmittelbar nach der Betäubung eine 2 - 5%ige Aureomycinlösung in das Blutgefäßsystem infun-

diert wurde (5, 30, 77).

In Versuchen zur Konservierungsverlängerung von Fleisch haben Henneberg und Habelt (21) mit Tetracyclin die günstigsten Ergebnisse bei einer Konzentration von 30 p.p.m. und einer Tauchzeit von 1 Std. erzielt.

In der Bundesrepublik ist es nach § 4b nicht erlaubt, Tieren vor der Schlachtung Antibiotika zu verabreichen, um dadurch die Haltbarkeit des Fleisches zu beeinflussen. Auch als Konservierungsmittel dürfen weder Antibiotika noch andere Hemmstoffe, außer den durch die Konservierungsstoff-VO. zugelassenen, als Zusatz zu Lebensmitteln verwendet werden, da sie Fremdstoffe im Sinne von § 4a des Lebensmittelgesetzes sind.

Über eine etwaige Schädigung des menschlichen Organismus durch den Verzehr von Nahrungsmitteln, die von Tieren stammen, welche nur nutritive Antibiotikamengen erhielten, oder von tierischen Produkten, denen Antibiotika in geringsten Dosen zwecks besserer Haltbarmachung zugesetzt wurden, sagt Freerksen (10) allerdings: "Daß der Mensch durch die Verwendung mit Antibiotika konservierter Nahrungsmittel geschädigt werden könne, ist eine durch nichts bewiesene Vermutung."

V. Biologische Testmethoden zur Ermittlung von Hemmstoffen

Für den Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln wurden verschiedene Tests entwickelt. Nachdem die Erfahrung gelehrt hat, daß chemische oder physikalische Nachweisverfahren sehr umständlich und kostspielig sind, gewannen "biologische Nachweise" mit Hilfe von Testkulturen besondere Bedeutung.

Diese Tests können in zwei große Gruppen unterteilt werden: Verfahren auf festen Nährböden (Diffusionsverfahren) und Verfahren in flüssigen Nährböden. Beiden Verfahren gemeinsam ist die Benutzung von verschiedenen Mikroorganismen, die mit dem zu untersuchenden Material oder einem Auszug davon in Verbindung gebracht werden. Wenn das Wachstum der Keime bei der Bebrütung unterdrückt wird, kann von der Probe angenommen werden, daß sie Hemmstoffe enthält.

Für das Diffusionsverfahren wurden verschiedene Methoden (36) entwickelt: ein Filterpapier- oder Blättchentest, wobei mit dem verdächtigen Material getränkte Filterpapierblättchen auf beimpfte Nährböden gelegt werden; eine Lochmethode, bei der aus dem beimpften Nähragar Löcher ausgebohrt werden, um die zu untersuchende Probe darin unterzubringen; eine Zylindermethode, bei welcher kleine Glaszylinder zur Aufnahme des Untersuchungsmaterials leicht in den Nährboden gedrückt werden; eine Mischagarmethode, bei der Material und Agar gemischt und dann beimpft werden. Die Ausdehnung der Hemmhöfe um das Untersuchungsmaterial herum zeigt dann nach der Bebrütung das Vorhandensein von Hemmstoffen an und läßt gewisse Schlüsse auf deren Menge in der Probe zu.

Das Diffusionsverfahren wird in großem Umfang bei Antibiotika-Wertigkeitsbestimmungen und bei der Feststellung der Empfindlichkeit von Krankheitserregern einem bestimmten Antibiotikum gegenüber angewendet, vereinzelt auch zum Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln.

So bedienen sich Kelch und Coretti (33) der Blättchentestmethode auf 0,1%igen Dextroseagarplatten (p_H 6,3), die vorher mit Testkeimen (Bac. cereus) beimpft wurden und anschließend bebrütet werden. Die Nachweisgrenze von Aureomycin soll bei 0,1 µg/g liegen.

Diese Nachweisgrenze wurde auch von Kissling (35) in seinen Diffusionstests nach einer speziellen Vorbehandlung des zu untersuchenden Stoffes ermittelt.

Van der Mijll Dekker und Mossel (50) konnten Chlortetracyclin in Nahrungsmitteln mit ihrem biologischen Mischagartest in der Konsentration von 0,1 µg/g nachweisen, während im Diffusionstest mit dem gleichen Nährboden nur 0,5 µg/g zu ermitteln waren.

Die Nachweise auf festen Nährböden dauern länger, so daß sie für einen Schnelltest kaum geeignet sind, trotz ihrer einfachen Handhabung. Außerdem ist hervorzuheben, daß Tests in flüssigem Milieu empfindlicher sind als solche auf festen Nährböden (42), weil dabei Untersuchungsmaterial und Nährmedium wesentlich intensiver vermischt und dadurch die Hemmstoffe besser extrahiert werden. Vor allem werden Nähr- und Hemmstoffe von den Keimen in flüssigem Milieu rascher und gründlicher aufgenommen. Dies bedingt kurze Versuchsdauer, was für einen

Routineschnelltest die Voraussetzung ist. Nachteilig allerdings ist, daß größere Extraktmengen benötigt werden als bei den Verfahren auf festen Nährböden.

Als Methode in flüssigem Nährmilieu haben sich der TTC (2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid)-Test (12, 42, 56, 57, 61, 70) und der Katalasetest (70) bewährt.

Kotter, Terplan und Schulz (42) haben das umfangreiche Schrifttum über biologische Nachweisverfahren von Hemmstoffen referiert und die Empfindlichkeit der wichtigsten Tests mit der von ihnen bekanntgegebenen Modifikation des auf Pratt und Dufrenoy (61) zurückgehenden TTC-Test verglichen. Diese Methode zeigte ausreichende und insgesamt größere Empfindlichkeit als die übrigen Nachweisverfahren.

Als weitere Verfahren zum Nachweis von Hemmstoffen in Nahrungsmitteln sei noch der von Mossel und Mitarbeiter (51, 52, 53) modifizierte Glukosevergärungstest nach Kluyver (38) erwähnt; Coretti (4) fand allerdings mit diesem Test relativ hohe Nachweisgrenzen für Hemmstoffe.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Methodik

Nieren von Schlachtschweinen werden nach den folgenden vier unspezifischen biologischen Hemmstofftestmethoden vergleichend untersucht.

1. Diffusionstest mit dem Nährboden nach van der Mijll Dekker und Mossel (50)

a) Vorbereitung des Teststammes

Zunächst wird ein Nährboden zur Züchtung der Testkeime hergestellt:

0,5 % Hefeextrakt,
1,5 % Trypton,
0,3 % Fleischextrakt,
1,5 % pepton. Milch,
0,1 % Dextrose und
1,5 % Agar.

Der Agar wird in Reagenzgläser abgefüllt, im Autoklaven sterilisiert und als Schrägagar vorrätig gehalten.

Als Testkeim wird Staphylococcus aureus (ATCC Nr. 6538 - P) nach 20-stündiger Bebrütung bei 37°C verwendet.

Der Teststamm soll bei der Anwendung nicht älter als drei Tage sein.

b) Zubereitung des Testnährbodens

30 g Agar werden 24 Std. gewässert und mit
10 g getrocknetem Hefeextrakt,
30 g Trypton,
6 g Fleischextrakt (Liebig),
30 g peptonisierter Milch,
2 g Glukose und
2 mg Riboflavin

in 900 ml Aqua dest. im Dampftopf ca. 1 Std. bei 100°C gelöst und dann durch Watte filtriert. Zu dieser Lösung kommen 100 ml eines 0,05 M - Phosphatpuffers. Dieser wird aus

3,40 g Kaliumdihydrogenphosphat und
3,90 g Dinatriumhydrogenphosphat,

die jeweils in 500 ml Aqua dest. gelöst werden, hergestellt, und zwar werden beide Lösungen miteinander so gemischt, daß das p_H 7,5 $\pm$ 0,1 beträgt (Spezial-Indikatorpapier Merck, p_H 7,2 - 8,6, Nr. 9362). Der Agar wird in sterilen Petrischalen im Kühlschrank vorrätig gehalten.

Von dem vorbereiteten Teststamm werden zwei Ösen auf den Agar übertragen und mit einem Drigalski-Spatel so verteilt, daß die Nährbodenoberfläche gleichmäßig mit Keimen bedeckt ist. Auf den beimpften Nährboden werden ein ca. 7 x 7 x 2 mm großes Stück der zu untersuchenden Niere und ein Filterblättchen von 1 cm Durchmesser gelegt, wobei das Filterblättchen mit dem Filtrat aus Test 3 und Test 4 getränkt ist. Nach 6- und 18stündiger Bebrütung bei 37°C wird das Wachstum der Keime überprüft. Hierzu beleuchtet man die Petrischale am besten indirekt, so daß Hemmhöfe, die sich bei positivem Ausfall des Tests bilden, deutlich zu erkennen sind.

Als Hemmhof wurde in diesen Untersuchungen die Breite der wachstumsfreien Zone zwischen Organ bzw. Filterblättchen und Rasen bezeichnet und mit einer Schublehre gemessen:

Hemmhöfe über 5 mm wurden mit +++ (eindeutige Hemmung),
von 3 - 5 mm mit ++ (mittelgradige Hemmung),
mit 2 mm mit + (schwache Hemmung) und
unter 2 mm mit (+) (fragliche Hemmung)

bewertet. War kein Hemmhof vorhanden, so wurde das Ergebnis als negativ = - notiert.

Dieser Diffusionstest wurde von van der Mijll Dekker und Mossel (50) weiterentwickelt zu einem "Mischagartest", der gegenüber Hemmstoffen empfindlicher sein sollte. Bei einem großen Teil der durchgeführten Vor- und Hauptversuche wurde dieser Mischagartest mit durchgeführt, aber in den Tabellen nicht berücksichtigt.

Vorbereitung des Teststammes, des Phosphatpuffers und des Agars erfolgen wie beim Diffusionstest. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß der Agar in warmem Zustand mit einem gleichgroßen Teil des zu untersuchenden Nierenbreies vermischt wird und unter Zusatz von 1 ml 1%iger TTC-Lösung in eine Petrischale ausgegossen wird. Nach Erstarrung wird dieser "Mischagar" umgestülpt, so daß die glatte Seite nach oben zu liegen kommt, die mit dem Teststamm in Form eines "V" von 2 cm

Schenkellänge beimpft wird. Danach erfolgt 18stündige Bebrütung bei 30° C.

Bei negativem Ergebnis wächst der Teststamm und reduziert TTC zu rotviolettem Formazan, während bei Anwesenheit von Hemmstoffen kein oder nur geringes Wachstum der Kultur und keine Formazanbildung zu beobachten sind.

Diese Methode wurde zu Beginn der Untersuchungen mit den übrigen Tests verglichen, dann jedoch fallen gelassen, da sich bei der Testung von Nierenbrei folgende Schwierigkeiten und Nachteile ergeben hatten:

1) Der in Kolben aufbewahrte Agar mußte für jeden Test neu verflüssigt werden, was sich dahingehend auswirkte, daß seine Konsistenz immer mehr abnahm und der Agar bald keinen festen Zustand mehr erlangte.

2) Für gutes Durchmischen wurden wesentlich größere Mengen an Agar und Nierenbrei benötigt, als sie zum Ausgießen erforderlich waren. Dadurch ergaben sich u. U. auch hohe Kosten für einen Routinetest.

3) Bei der Bebrütung des gemischten Agars kam es zu Gasbildung, Verflüssigung des Agars und übler Geruchsentwicklung, weil durch die kurzzeitige Erhitzung des Mischagars auf ca. 80° C ein großer Teil der Keime, die hauptsächlich im Nierenbrei vorhanden sind, insbesondere Sporenbildner, nicht abgetötet wurden.

4) Die Durchführung des Mischagartests nahm wesentlich mehr Zeit in Anspruch als die der übrigen.

5) Die Beschaffung der von den Autoren angegebenen Grundsubstanzen brachte erhebliche Kosten mit sich und erforderte z. T. Importe.

6) Die Ergebnisse des Mischagartests zeigten in den Untersuchungen keine Unterschiede gegenüber dem Diffusionstest; im Vergleich zum TTC-Test und zum Katalasetest war die Empfindlichkeit des Mischagartests sogar erheblich geringer.

7) Chloramphenicol und Streptomycin ließen sich auch mit dem Mischagartest nicht nachweisen.

2. Agardiffusionstest

a) Vorbereitung des Teststammes

Zunächst wurde ein Nährboden zur Züchtung der Testkeime hergestellt aus:

1 % Pepton (Witte),
1 % Fleischextrakt (Liebig),
30 % Kochsalz und
25 % Agar.

Das p_H wurde auf 6,5 eingestellt (Spezial-Indikatorpapier Merck, p_H 5,4 - 7,0, Nr. 9356). Der Agar wurde in Reagenzgläser abgefüllt, im Autoklaven sterilisiert und als Schrägagar vorrätig gehalten.

Als Testkeim wurde Staphylococcus aureus (ATCC Nr. 6538 - P) nach 20stündiger Bebrütung bei 37°C verwendet. Der Teststamm soll bei der Anwendung nicht älter als 3 Tage sein.

b) Zubereitung des Testnährbodens

25 g Agar wurden 24 Std. gewässert und mit
10 g Pepton (Witte),
10 g Fleischextrakt (Liebig) und
30 g Kochsalz

in 1000 ml Aqua dest. im Dampftopf ca. 1 Std. bei 100°C gelöst und dann durch Watte filtriert. Darauf erfolgten Einstellung des p_H-Wertes auf 6,5 und Sterilisation im Autoklaven.

Der Agar wurde in sterilen Petrischalen im Kühlschrank vorrätig gehalten. Überimpfung, Technik und Beurteilung erfolgten wie bei Test 1 (s. S. 14).

3. TTC-Test (70)

Vor Versuchsbeginn wurden Erlenmeyerkolben und Reagenzgläser gründlich gewässert und letztere mit den dazu passenden Gummistopfen in Aqua dest. ausgekocht.

a) Herstellung von Peptonwasser

10 g Pepton (Witte),
10 g Dextrose und
10 g Kochsalz

wurden in 1000 ml Aqua dest. aufgekocht.

b) Herstellung des Filtrates

Die Niere wurde von Fett und Nierenhilus befreit und im Starmix zu Nierenbrei zerkleinert. Von dem Nierenbrei wurden 100 g mit 200 ml Peptonwasser im Erlenmeyerkolben (300 ml-Kolben) gründlich gemischt und unter Umrühren mit einem Thermometer, mit dem gleichzeitig die Temperatur abgelesen wurde, 5 min bei 80° C erhitzt, so daß die rötliche Farbe des Nierenbrei-Peptonwasser-Gemisches grau wurde. Anschließend wurde durch einen Selecta-Falten-Filter Nr. 520 b 1/2 filtriert. (Dieses Filtrat soll Urinfarbe haben und auf keinen Fall gerötet sein. Bei eventuell auftretender Rötung muß nochmals erhitzt und filtriert werden.) Dann wurde das p_H auf 6,5 eingestellt.

c) Zubereitung einer Bouillon-Testkultur

Zunächst wurde aus Rindfleisch Fleischwasserbouillon angefertigt, in 10 ml-Reagenzgläser abgefüllt und autoklaviert. Von einer Schrägagarkultur des Teststammes Staphylococcus aureus (ATCC Nr. 6538 - P) nach Test 2, a wurde die Bouillon beimpft und 24 Std. bei 37° C bebrütet. Diese erste Bouillonkultur wurde mit einer Platinöse von 3 mm Durchmesser auf eine weitere Bouillon überimpft, die wiederum 24 Std. bebrütet wurde.

Die zu verwendende Bouillon-Testkultur soll also durch mindestens eine Bouillon-Passage gegangen sein und nach 18-24stündiger Bebrütung sofort benutzt werden. Als Einsaat wurde 5fach verdünnte Bouillon-Testkultur verwendet, d. h. 1 ml Testkultur wurden mit 4 ml Peptonwasser verdünnt.

d) Testverfahren

In 3 Reagenzgläser wurden je 1 ml der verdünnten Testkultur gefüllt; dazu kamen 9 ml des Filtrates. Nach 3stündiger Bebrütung im Wasserbad bei 37° C wurden 0,5 ml einer 2%igen 2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung (TTC) zugesetzt, das Reagenzglas mit einem Gummistopfen verschlossen und gut gemischt. Darauf erfolgte eine weitere 30minütige Bebrütung im abgedunkelten Wasserbad bei 37° C.

e) Kontrollen

aa) Filtratkontrolle: Filtrat mit TTC versetzt und 30 min bebrütet, zur Ermittlung von im Filtrat eventuell noch vorhandenen Keimen oder aktiven Reduktasen.

bb) Filtrat-Eigenfarbe-Kontrolle: beimpfter und bebrüteter Extrakt ohne TTC-Zusatz, zum späteren Farbvergleich.

cc) Testkulturkontrolle: beimpftes, hemmstofffreies Peptonwasser, das im übrigen wie das Filtrat selbst behandelt wird. (Diese Kontrolle erscheint häufig weniger rot als die Probe.)

f) Beurteilung

Die Beurteilung erfolgt nach der Intensität der Reduktion des farblosen TTC zu rot-violettem Formazan.

Keine Umrötung	=	+++ (eindeutige Hemmung)
kaum Umrötung	=	++ (mittelgradige Hemmung)
leichte Umrötung	=	+ (schwache Hemmung)
mäßige Umrötung	=	(+) (fragliche Hemmung)
starke Umrötung	=	- (keine Hemmung).

4. Katalasetest (70)

Vor Versuchsbeginn wurden Erlenmeyerkolben und Reagenzgläser gründlich gewässert und letztere mit den dazu passenden durchbohrten Gummistopfen in Aqua dest. ausgekocht.

a) Herstellung von Peptonwasser

s. 3, a (TTC-Test)

b) Herstellung des Filtrates

s. 3, b (TTC-Test)

c) Zubereitung einer Bouillon-Testkultur

s. 3, c, Absatz 1 (TTC-Test)

Die zu verwendende Bouillon-Testkultur soll durch mindestens eine Bouillon-Passage gegangen sein und nach 18 - 24stündiger Bebrütung bei

37° C sofort benutzt werden. Als Einsaat wurde eine 20fach verdünnte Bouillon-Testkultur verwendet, d. h. 1 ml Testkultur wurde mit 19 ml Peptonwasser verdünnt.

d) Testverfahren

In 3 graduierte 10 ml-Reagenzgläser wurden je 1 ml der verdünnten Testkultur gefüllt; dazu kamen 9 ml des Filtrats (F). Nach 3stündiger Bebrütung im Brutschrank bei 37° C wurden 3 ml einer 2%igen H_2O_2-Lösung zugesetzt, das Reagenzglas mit einem Gummistopfen verschlossen, der zentral von einem kurzen, engen Glasröhrchen durchbohrt ist und das Reagenzglas mit dem Verschluß nach unten in ein Gestell verbracht. Die austropfende Flüssigkeit wurde in einer Wanne oder dergleichen aufgefangen.

Der obere Flüssigkeitsspiegel im Reagenzglas wurde sofort und nach 1 Std. abgelesen und durch Subtraktion die durch Katalase freigesetzte O_2-Menge berechnet. Von den 3 Ergebnissen wurde das Mittel berechnet.

e) Kontrollen

aa) Filtratkontrolle (FK): unbeimpftes und unbebrütetes Filtrat, das mit 3 ml H_2O_2 (2%ig) versetzt wurde, diente zur Ermittlung eventuell noch nicht inaktivierter Gewebe- oder Keimkatalase im Filtrat.

bb) Blindprobe (BP): beimpftes, aber unbebrütetes Peptonwasser, das sofort nach dem Ansetzen auf 37° C erwärmt und mit 3 ml H_2O_2 (2%ig) versetzt wurde, zur Ermittlung der Katalaseaktivität der zugesetzten Keime. Die hier ermittelten Werte gaben gleichzeitig Anhaltspunkte für die Länge der Bebrütung: ist die O_2-Bildung 1 ml oder größer, genügt eine Bebrütungszeit von 3 Std., ist sie geringer, so sollte 3 1/2 - 4 Std. bebrütet werden.

cc) Peptonwasserkontrolle (PW) = eigentliche Kontrolle: beimpftes Peptonwasser, das wie das Filtrat selbst behandelt wurde.

f) Beurteilung

Die Berechnung der Hemmung erfolgt nach der Formel:

$$\text{Hemmung} = 100 - \frac{(F - FK - BP) \times 100}{PW - BP}$$

Wie bereits frühere Untersuchungen (70) ergeben haben, treten bei dieser Methode Schwankungen auf. Auf Grund von Untersuchungen an hemmstofffreien Nieren (s. Vorversuche, 1) wird die Beurteilung der festgestellten Hemmung nach folgenden Gesichtspunkten vorgenommen:

Hemmung bis 60%	= -	(keine Anhaltspunkte für das Vorliegen von Hemmstoffen)
Hemmung von 60 - 70%	= (+)	(erheblicher Verdacht)
Hemmung über 70%	= +	(positiver Ausfall des Tests).

II. Vorversuche

1. Ermittlung der Eigenhemmung von antibiotikafreien Nieren mittels Katalase- und TTC-Test

Da auch im tierischen Organismus Inhibine gebildet werden können (7), mußte zunächst ermittelt werden, inwieweit Filtrate hemmstofffreier Nieren das Keimwachstum bzw. die Katalasebildung beeinflussen. Dazu wurden Nieren von Schweinen, die weder therapeutisch noch nutritiv Antibiotika erhalten hatten, mit dem Katalase- und dem TTC-Test untersucht (Tab. 1).

Tabelle 1: Eigenhemmung antibiotikafreier Schweinenieren im Katalase- und TTC-Test

Lfd. Nr.	Katalasetest (Hemmung in %)	TTC-Test
1	52,4	-
2	53,1	-
3	33,4	-
4	48,5	-
5	63,9	-
6	55,8	-
7	57,9	-
8	49,3	-
9	52,4	-
10	48,8	-
11	55,6	-
12	41,3	-
13	50,1	-
14	46,1	-
15	52,1	-

Anmerkung zu Tab. 1:
Bei Nr. 1 - 7 handelt es sich um Nieren, die bei einem Metzger gekauft wurden, der die Schweine am Schlacht- und Viehhof München erworben und geschlachtet hatte, wobei diese Tiere mindestens 2 - 3 Tage vor der Schlachtung sicher keiner Antibiotika-Applikation unterzogen werden konnten. - Nr. 8 - 15 waren Nieren von Schweinen, die 3 Tage und zum Teil noch länger in einer Fleischwarenfabrik gehalten wurden; diese Nieren wurden sofort nach der Schlachtung untersucht.

Berechnung der Eigenhemmung:
Mit Hilfe einer einfachen Wahrscheinlichkeitsberechnung wurde der Streuungsbereich der ermittelten Eigenhemmwerte festgestellt. Der durchschnittliche Eigenhemmwert der Nieren liegt bei 50,7%. Die Varianz beträgt 50,65, woraus sich für eine Wahrscheinlichkeit von 99% eine Streuung von $\pm$ 18,4% ergibt.

Demnach werden alle Hemmungen, die größer als 50,7 + 18,4% = 69,1% (also 70%) sind, mit 99% Wahrscheinlichkeit durch Hemmstoffe bewirkt.

Aus dieser Berechnung läßt sich selbstverständlich nicht ableiten, daß alle Proben, die eine Hemmung von weniger als 70% aufweisen, hemmstofffrei sind.

Späteren Untersuchungen, in denen Antibiotika zu Nierenbrei hinzugesetzt wurden oder in denen Nieren von mit unterschiedlichen Dosen Aquacillin (Bayer) behandelten Schweinen getestet wurden, kann entnommen werden, daß auch bei Vorliegen von Hemmstoffen, allerdings bei geringen Konzentrationen, Hemmungen unter 70% zu verzeichnen waren, was mit positiven Ergebnissen des TTC-Tests übereinstimmte.

Auf Grund dieser Beobachtungen und Berechnungen werden Hemmungen zwischen 60 und 70% als fraglich = (+) bezeichnet, über 70% als positiv = +.

2. Nachweis verschiedener Antibiotika, die zerkleinerten Nieren zugesetzt wurden

Zunächst mußte geklärt werden, welche von den gebräuchlichen Antibiotika überhaupt mit den angewandten vier Tests zu erfassen sind und welche Konzentrationen eines Antibiotikums nötig sind, um einen positiven Ausfall der Tests zu bewirken. Deshalb wurden die Reinsubstanzen von folgenden Antibiotika überprüft:

Chloramphenicol in Reinsubstanz
(Parke, Davis & Co.),
Streptomycin für Testzwecke
(Behring-Werke),
Aureomycin für Testzwecke
(Lederle) und
Penicillin-G-Kalium für Testzwecke
(Bayer).

Diese Antibiotika wurden in 300 ml-Erlenmeyerkolben in verschiedenen Mengen mit Nierenbrei vermischt, der darauf mit allen vier Methoden in der beschriebenen Weise getestet wurde.

a) Nachweis von Chloramphenicol, Streptomycin und Aureomycin

Versuchsanordnung:
600 g beim Metzger gekaufte Schweinenieren wurden von Fett und Hilus befreit, in kleine Stücke zerschnitten und im Starmix zu Nierenbrei zerkleinert. In 3 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden jeweils 100 g Nierenbrei eingefüllt und dazu je 1 ml der Chloramphenicolverdünnungen pipettiert. Die Chloramphenicolverdünnungen in steriler physiologischer Kochsalzlösung betrugen 1,0 mg/ml, 100 µg/ml, 10,0 µg/ml.
Nach der Mischung mit dem Nierenbrei resultierten folgende Konzentrationen:

10,0 µg Chloramphenicol/g Nierenbrei,
1,0 µg " " ,
0,1 µg " " , und
0,01 µg " " .

Dem 5. Erlenmeyerkolben mit 100 g Nierenbrei wurde lediglich 1 ml physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt (hemmstofffreie Kontrolle). Nach einer Einwirkungszeit von 30 min unter häufigem Umrühren wurden die vier Tests durchgeführt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 2 ersichtlich.

Die entsprechenden Versuche mit Streptomycin (Tab. 3) und Aureomycin (Tab. 4, 5 und 6) wurden nach gleicher Versuchsanordnung vorgenommen.

b) Nachweis von Penicillin

Versuchsanordnung:
Die Behandlung der Nieren erfolgte wie bei dem getesteten Chloramphenicol (s. o.). Zu dem eingefüllten Nierenbrei wurden je 1 ml der Penicillin-G-Kalium-Verdünnungen pipettiert. Die Penicillin-G-Kalium-Verdünnungen in steriler physiologischer Kochsalzlösung betrugen 1000 E/ml, 100 E/ml, 10 E/ml und 1 E/ml. Nach der Mischung mit dem Nierenbrei resultierten folgende Konzentrationen:

10,0 E Penicillin-G-Kalium/g Nierenbrei,
1,0 E " " " ,
0,1 E " " " und
0,01 E " " " .

Dem 5. Erlenmeyerkolben mit 100 g Nierenbrei wurde lediglich 1 ml physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt (hemmstoff-freie Kontrolle). Nach

einer Einwirkungszeit von 30 min unter häufigem Umrühren wurden die vier Tests durchgeführt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 6 ersichtlich.

Tabelle 2: Nachweis von Chloramphenicol, das Schweinenierenbrei zugesetzt wurde

Test	Chloramphenicol-Konzentration in µg/g														
	10,0			1,0			0,1			0,01			0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I 1	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
I 2	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
II 1	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
II 2	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
III	+++	+++	+++	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	+			+			-			-			-		
Hemmung in %	90			72			59			54			52		

Zeichenerklärung:

I = Diffusionstest mit dem Nährboden nach van der Mijll Dekker und Mossel
II = Agardiffusionstest
III = TTC-Test
IV = Katalasetest
1 = Hemmhofablesung nach 6 Std. Bebrütungszeit
2 = Hemmhofablesung nach 18 Std. Bebrütungszeit
a = Nierenstück bei Plattentest (I und II) bzw. Reagenzglas eins beim TTC-Test (III)
b = Reagenzglas zwei beim TTC-Test (III) bzw. Testergebnis beim Katalasetest (IV)
c = filtratgetränktes Blättchen bei Plattentests (I und II) bzw. Reagenzglas drei beim TTC-Test (III)

Für die Plattentests (I und II) sind:

+++	= Hemmhöfe über 5 mm		(eindeutige Hemmung)
++	= " von 3 - 5 mm		(mittelgradige Hemmung)
+	= " mit 2 mm		(schwache Hemmung)
(+)	= " unter 2 mm		(fragliche Hemmung)
-	= kein Hemmhof		(keine Hemmung)

Für den TTC-Test (III) sind:

+++	= Keine Umrötung	(eindeutige Hemmung)
++	= Kaum Umrötung	(mittelgradige Hemmung)
+	= Leichte Umrötung	(schwache Hemmung)
(+)	= Mäßige Umrötung	(fragliche Hemmung)
-	= Starke Umrötung	(keine Hemmung)

Für den Katalasetest (IV) sind:

+	= Hemmung über 70 %	(eindeutige Hemmung)
(+)	= Hemmung von 60 - 70 %	(fragliche Hemmung)
-	= Hemmung bis 60 %	(keine Hemmung)

Tabelle 3: Nachweis von Streptomycin, das Schweinenierenbrei zugesetzt wurde

Test	Streptomycin-Konzentration in µg/g														
	10,0			1,0			0,1			0,01			0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I 1	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
I 2	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
II 1	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
II 2	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-
III	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV		+			(+)			(+)			(+)			-	
Hemmung in %		76			65			67			65			53	

Zeichenerklärung: siehe Tab. 2, Seite 24.

Tabelle 4: Nachweis von Aureomycin, das Schweinenierenbrei zugesetzt wurde

Test	Aureomycin Konzentration in µg/g														
	10,0			1,0			0,1			0,01			0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I 1	++		++	+		+	-		-	-		-	-		-
I 2	++		+	-		(+)	-		-	-		-	-		-
II 1	++		++	(+)		(+)	-		-	-		-	-		-
II 2	++		+	-		-	-		-	-		-	-		-
III	+++	+++	+++	++	++	++	(+)	+	(+)	-	-	-	-	-	-
IV		+			+			(+)			-			-	
Hemmung in %		104			100			65			50			53	

Zeichenerklärung: siehe Tab. 2, Seite 24.

Tabelle 5: Nachweis von Aureomycin, das Schweinenierenbrei zugesetzt wurde

Test	Aureomycin - Konzentration in µg/g														
	10,0			1,0			0,1			0,01			0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I 1	+++		+++	++		(+)	-		-	-		-	-		-
I 2	+++		++	(+)		-	-		-	-		-	-		-
II 1	+++		+++	++		(+)	-		-	-		-	-		-
II 2	+++		++	(+)		-	-		-	-		-	-		-
III	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
IV		+			+			+			-			-	
Hemmung in %		102			100			80			59			49	

Zeichenerklärung: siehe Tab. 2, Seite 24.

Tabelle 6: Nachweis von Aureomycin, das Rindernierenbrei zugesetzt wurde

Test	Aureomycin-Konzentration in µg/g														
	10,0			1,0			0,1			0,01			0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I 1	+++		+++	++		+	-		(+)	-		-	-		-
I 2	+++		+++	+		(+)	-		-	-		-	-		-
II 1	+++		+++	++		+	-		(+)	-		-	-		-
II 2	++		++	(+)		-	-		-	-		-	-		-
III	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	(+)	(+)	(+)	-	-	-
IV		+			+			(+)			+			-	
Hemmung in %		104			97			67			70			55	

Zeichenerklärung: siehe Tab. 2, Seite 24.

Tabelle 7: Nachweis von Penicillin-G-Kalium, das Schweinenierenbrei zugesetzt wurde

Test	Penicillin-G-Kalium-Konzentration in E/g														
	10,0			1,0			0,1			0,01			0		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I 1	+++		+++	+++		+++	-		-	-		-	-		-
I 2	+++		+++	++		++	-		-	-		-	-		-
II 1	+++		+++	+++		+++	-		-	-		-	-		-
II 2	+++		+++	++		++	-		-	-		-	-		-
III	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-
IV		+			+			+			+			(+)	
Hemmung in %		96			86			70			71			64	

Zeichenerklärung: siehe Tab. 2, Seite 24.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Versuchsergebnisse aus Tab. 2 - 7

	Antibiotika-Konzentration/g Nierenbrei in µg bzw. E +)			
	10,0	1,0	0,1	0,01
Diffusionstest mit dem Nährboden nach van der Mijll Dekker und Mossel				
Chloramphenicol (Tab. 2)	-	-	-	-
Streptomycin (Tab. 3)	-	-	-	-
Aureomycin (Tab. 4)	++	+	-	-
Aureomycin (Tab. 5)	+++	+	-	-
Aureomycin (Tab. 6)	+++	+	-	-
Penicillin (Tab. 7)	+++	+++	-	-
Agardiffusionstest				
Chloramphenicol (Tab. 2)	-	-	-	-
Streptomycin (Tab. 3)	-	-	-	-
Aureomycin (Tab. 4)	++	(+)	-	-
Aureomycin (Tab. 5)	+++	+	-	-
Aureomycin (Tab. 6)	+++	+	-	-
Penicillin (Tab. 7)	+++	+++	-	-
TTC-Test				
Chloramphenicol (Tab. 2)	+++	(+)	-	-
Streptomycin (Tab. 3)	(+)	-	-	-
Aureomycin (Tab. 4)	+++	++	(+)	-
Aureomycin (Tab. 5)	+++	+++	+	-
Aureomycin (Tab. 6)	+++	+++	++	(+)
Penicillin (Tab. 7)	+++	+++	+	(+)
Katalasetest				
Chloramphenicol (Tab. 2)	+	+	-	-
Streptomycin (Tab. 3)	+	(+)	(+)	-
Aureomycin (Tab. 4)	+	+	(+)	-
Aureomycin (Tab. 5)	+	+	+	-
Aureomycin (Tab. 6)	+	+	(+)	+
Penicillin (Tab. 7)	+	+	+	+

+) bei Penicillin-G-Kalium

Zeichenerklärung: siehe Seite 24, Tab. 2.

c) Besprechung der Ergebnisse

Aus den Versuchen, bei denen zerkleinerten Nieren Antibiotika zugesetzt wurden (Tab. 2 - 8), kann folgendes entnommen werden:

Alle vier Tests waren in dieser Form zum Nachweis von Chloramphenicol und Streptomycin ungeeignet, während sich Aureomycin und Penicillin-G-Kalium gut nachweisen ließen.

Aureomycin und Penicillin-G-Kalium konnten im Nierenbrei mit dem TTC-Test in Konzentrationen von 0,1 µg/g bzw. E/g ermittelt werden; in der nächstniedrigen geprüften Konzentration (0,01 µg bzw. E/g) verlief der Test negativ bei Aureomycin und bei Penicillin fraglich.

Mit dem Katalasetest war Aureomycin teils bei 0,1 µg/g, teils aber erst bei 1,0 µg/g nachzuweisen, während Penicillin bei 0,01 E/g noch einen positiven Test ergab. Bei diesem Ergebnis ist allerdings zu berücksichtigen, daß der zusatzfreie Nierenbrei auch schon fragliche Hemmung zeigte.

Bei den Diffusionstests bildeten sich bei Aureomycin-Konzentrationen von 1,0 µg Hemmhöfe von 2 mm (schwache Hemmung), bei Penicillin in der gleichen Konzentration Hemmhöfe über 5 mm (eindeutige Hemmung).

III. Hauptversuche

1. Anwendung der Tests bei Nieren von Schweinen, die mit bekannten Mengen eines Antibiotikums behandelt worden waren

a) Versuchsanordnung

Es wurde 19 gesunden Schlachtschweinen von durchschnittlich 100 kg Lebendgewicht Aquacillin "Bayer" in Dosen von 500 000 bis 1 600 000 E handbreit hinterm Ohr, intramuskulär, injiziert. Die hohen, in der Praxis nicht üblichen Aquacillindosen über 1 000 000 E waren gewählt worden, da die normalen Dosen nach 48 Std. Einwirkungszeit höchstens noch fragliche Ergebnisse lieferten und weil noch festgestellt werden sollte, ob extrem hohe Mengen Aquacillin nach der langen Einwirkungsdauer unabhängig von der Konzentration überhaupt nachzuweisen sind.

Die Tiere wurden in verschiedenen Zeiträumen nach der Injektion geschlachtet und eine Niere mit den angegebenen Tests spätestens 2 Std.

nach der Schlachtung untersucht. Die Zeit zwischen Injektion und Schlachtung, in der also das Aquacillin im Körper einwirkt, wurde in den Versuchen als Einwirkungszeit bezeichnet. Die injizierten Mengen Aquacillin und die Einwirkungszeiten sind in den Tabellen vermerkt, ebenso die Lebendgewichte der Schweine.

Die 2. Niere wurde in Pergamentpapier verpackt, in einem Pappkarton mit Holzwolle 24 Std. bei Zimmertemperatur von 18 - 21° C gelagert und dann getestet. Hiermit sollten annähernd gleiche Bedingungen geschaffen werden, wie sie bei der Versendung von Organproben zur bakteriologischen Fleischuntersuchung gegeben sind.

Die Aufbewahrungszeit der 2. Niere bei Zimmertemperatur beträgt in allen Versuchen 24 Std. und wird in den Tabellen als Lagerungszeit bezeichnet.

Bei den Schweinen Nr. 1, 2, 4, 10, 15, 17 und 19 wurden auch Fleischproben aus den Schinken mit allen vier Tests untersucht. Die Ergebnisse dieser Fleischproben waren bei allen Tests negativ; sie wurden auch in den Tabellen nicht berücksichtigt. Weitere Untersuchungen der Muskulatur unterblieben, weil sich herausstellte, daß auch bei antibiotikahaltigen Nieren das vom gleichen Tier stammende Fleisch stets negativen Testausfall ergab.

b) Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse der unmittelbar nach der Schlachtung untersuchten Nieren sind in Tab. 9, die nach 24stündiger Lagerung untersuchten in Tab. 10 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Hemmstofftests bei unmittelbar nach der Schlachtung untersuchten Nieren

Lfd. Nr.	Lebd. gew. in kg	Einw. zeit in Std.	Aquacil. menge in Mill. E	Versuchsergebnis mit Test I N	I B	II N	II B	III	IV %	Gesamt-ergebn.
1	100	24	1,0	++	+	++	+	+++	+ 87	+
2	107	24	1,0	++	+	++	+	+++	+ 82	+
3	100	24	0,8	++	+	++	(+)	++	+ 79	+
4	110	24	0,5	-	-	-	-	-	(+) 63	-
5	85	24	0,5	-	-	-	-	(+)	(+) 69	(+)
6	110	48	1,6	-	-	-	-	-	(+) 63	-
7	102	48	1,6	-	-	-	-	-	(+) 63	-
8	99	48	1,2	(+)	-	(+)	-	-	(+) 67	(+)
9	109	48	1,2	-	-	-	-	-	- 59	-
10	103	48	1,0	-	-	-	-	-	(+) 63	-
11	93	48	1,0	-	-	-	-	+	+ 72	+
12	87	48	0,8	++	+	+	-	+++	+ 82	+
13	106	48	0,8	-	-	-	-	-	(+) 61	-
14	103	48	0,8	-	-	-	-	-	(+) 60	-
15	94	48	0,5	-	-	-	-	-	- 56	-
16	88	48	0,5	-	-	-	-	-	(+) 65	-
17	95	72	1,0	-	-	-	-	-	(+) 61	-
18	97	72	1,0	-	-	-	-	-	(+) 65	-
19	104	72	0,5	-	-	-	-	-	- 54	-

Zeichenerklärung:

N = Nierenstück bei Plattentests

B = filtratgetränktes Blättchen bei Plattentests

Sonstige Zeichen sind in Tab. 2, Seite 24 erklärt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Hemmstofftests bei Nieren, die nach der Schlachtung der Versuchstiere 24 Std. unter Versandbedingungen gelagert wurden

Lfd. Nr.	Lebd. gew. in kg	Einw. zeit in Std.	Aquacil. menge in Mill. E	Versuchsergebnis mit Test I N	I B	II N	II B	III	IV	IV %	Gesamt-ergebn.
1	100	24	1,0	++	(+)	++	(+)	++	+	86	+
2	107	24	1,0	+	+	(+)	(+)	++	+	81	+
3	100	24	0,8	+	+	(+)	-	+	+	75	+
4	110	24	0,5	-	-	-	-	-	(+)	65	-
5	85	24	0,5	-	-	-	-	-	(+)	64	-
6	110	48	1,6	-	-	-	-	-	-	59	-
7	102	48	1,6	-	-	-	-	-	-	56	-
8	99	48	1,2	-	-	-	-	(+)	-	52	-
9	109	48	1,2	-	-	-	-	-	-	55	-
10	103	48	1,0	-	-	-	-	-	-	55	-
11	93	48	1,0	-	-	-	-	+	+	72	+
12	87	48	0,8	+	-	(+)	-	++	+	74	+
13	106	48	0,8	-	-	-	-	-	-	49	-
14	103	48	0,8	-	-	-	-	-	-	47	-
15	94	48	0,5	-	-	-	-	-	-	49	-
16	88	48	0,5	-	-	-	-	-	-	58	-
17	95	72	1,0	-	-	-	-	-	-	53	-
18	97	72	1,0	-	-	-	-	-	-	58	-
19	104	72	0,5	-	-	-	-	-	-	55	-

Zeichenerklärung: siehe Tab. 9, Seite 31.

c) Besprechung der Ergebnisse

Aquacillin ist mit allen geprüften Tests in Nieren nachweisbar, wenn den Schweinen mindestens 800 000 E verabreicht wurden und die Einwirkungszeit 24 Std. betrug. Bei einer geringeren Dosierung (500 000) waren von 2 Versuchstieren eins fraglich im TTC- und Katalasetest, das andere fraglich nur im Katalasetest. Nach 48 und 72 Std. Einwirkungszeit waren die Ergebnisse aller Testmethoden negativ, mit Ausnahme der Nieren eines kranken Schweines (lfd. Nr. 12) und des Katalase- und TTC-Tests bei einer Niere, die von einem Schwein stammte, das 1 Mill. E Aquacillin erhalten hatte und 48 Std. nach der Injektion geschlachtet wurde (lfd. Nr. 11). Bei einem anderen Schwein (lfd. Nr. 8) war der TTC-Test schwach positiv; die Einwirkungszeit der 1,2 Mill. E Aquacillin betrug 48 Std., das Gewicht nur 99 kg.

Schwein Nr. 12 zeigte bei der Injektion starke Lähmungserscheinungen auf der Hinterhand; diese konnte nicht aufgesetzt werden. Beim Versuch des Auftreibens bestand starke Schmerzhaftigkeit. Es handelte sich um eine hochgradige Form von Rachitis, wodurch die Stoffwechselfunktion so sehr herabgesetzt war, daß vermutlich auch die Ausscheidung des Antibiotikums verzögert wurde.

Schwein Nr. 11 kam aus dem gleichen Bestand und ließ ähnliche Krankheitserscheinungen erkennen wie Schwein Nr. 12, nur in wesentlich geringerem Ausmaße. Auch bei diesem Tier wäre - die zwar geringere - Ausscheidungsverzögerung des Antibiotikums in gleicher Weise zu erklären.

Die 24 Std. lang gelagerten Nieren ergaben nur unwesentlich abweichende Ergebnisse im Vergleich mit den sofort getesteten.

2. Anwendung der Tests bei Nieren von Tieren, bei denen eine bakteriologische Fleischuntersuchung stattfand

Um eine praxisnahe Anwendung der Tests zu prüfen, wurden Nieren von 8 Tieren untersucht, deren Organe zur bakteriologischen Fleischuntersuchung eingesandt worden waren. Auf Grund der Diagnose in den Untersuchungsanträgen wurden nur solche Fälle ausgesucht, in denen eine Applikation von Antibiotika als Therapie zu erwarten war.

Bei diesen Untersuchungen wurde auch der Mischagartest nach van der Mijll Dekker und Mossel (50) angewendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der Hemmstofftests bei Nieren von Tieren, deren Organe zur bakteriologischen Fleischuntersuchung eingesandt worden waren

Lfd. Nr.	Tierart	I Misch	I N	I B	II N	II B	III	IV	%	Diagnose
1	Rd.	-	-	-	-	-	-	-	54	Endometritis
2	Rd.	-	-	-	-	-	-	-	43	FK-Peritonitis
3	Rd.	-	-	-	-	-	-	-	42	Pneumonie
4	Rd.	-	-	-	-	-	-	-	57	Retentio sec.
5	Schw.	-	-	-	-	-	-	-	52	Notschltg.
6	Kalb	-	-	-	-	-	-	-	49	Polyarthritis
7	Rd.	-	-	-	-	-	(+)	(+)	66	Mastitis
8	Rd.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	88	FK-Operation

Zeichenerklärung:

Misch = Mischagar
sonstige Zeichen sind in Tab. 2, Seite 24 erklärt.

Bei der Niere eines Tieres, das nach einer Fremdkörperoperation geschlachtet wurde, verliefen alle Tests positiv, so daß eine vorausgegangene Antibiotika-, eventuell auch eine Sulfonamid-Therapie stattgefunden haben muß (lfd. Nr. 8).

Bei einem Rd. (lfd. Nr. 7) zeigten TTC- und Katalasetest fragliche Ergebnisse; auch hier läge eine Antibiotika-Behandlung im Bereich des Möglichen. Bei allen anderen Nieren verliefen die Tests negativ.

D. DISKUSSION

Von den im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden zur Bestimmung von Hemmstoffen war jede für sich bereits von anderen Autoren als geeignet befunden worden, um als unspezifisches Nachweisverfahren eingesetzt zu werden. Über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden bestand weitgehend Klarheit, jedoch war noch zu ermitteln, welche Methode am empfindlichsten und am zweckmäßigsten für den Hemmstoffnachweis bei Schlachttieren ist.

Nachdem bisherige Untersuchungen zum Teil nur an Lösungen von Antibiotika in flüssigen Nährböden vorgenommen waren, sollte gleichzeitig noch geprüft werden, wie die Nachweisgrenze durch das tierische Gewebe, in dem ja der Nachweis zu führen ist, beeinflußt wird, insbesondere, ob eventuell mit Eigenhemmung durch Gewebsextrakt zu rechnen ist.

Bei Diffusions- und TTC-Test war keine Eigenhemmung des Gewebes festzustellen. Bei letzterem waren sogar die filtratfreien Kontrollen regelmäßig heller rot - also scheinbar gehemmt - gegenüber den hemmstofffreien Filtraten, dagegen war beim Katalasetest eine Eigenhemmung nachzuweisen, die im Mittel 50 % betrug. Die statistische Auswertung dieser Versuche ergab, daß im Katalasetest erst Hemmungen von 70 % und darüber als positive Ergebnisse gewertet werden können.

Von den vier gebräuchlichen Antibiotika, die Nierenbrei zugesetzt worden waren, konnte Streptomycin nur mit TTC- und Katalasetest ermittelt werden, wobei der TTC-Test eine fragliche Hemmung bei 10,0 µg/g, während der Katalasetest bei der gleichen Konzentration deutliche und bei 1,0 µg/g fragliche Hemmung aufwies. Mit den beiden Diffusionsverfahren war Streptomycin nicht nachweisbar, vermutlich, weil das Streptomycin erst bei p_H 7,8 optimal wirkt und die p_H-Werte der Nährböden 6,5 betrugen. Zudem ist der Teststamm Staphylococcus aureus (ATCC Nr. 6538-P) gegenüber diesem Antibiotikum nicht besonders empfindlich (36). Kotter, Terplan und Schulz (42) konnten mit dem TTC-Test allerdings Streptomycin, das im Nährboden gelöst war, bei p_H 6,5 in einer Menge von 0,6 - 1,25 µg/ml Bouillon auffinden.

Chloramphenicol gab ebenfalls nur mit TTC- und Katalasetest positiven Hemmstoffnachweis, und zwar bei einer Konzentration von 10,0 µg/g

Nierenbrei; bei der nächstniedrigen Konzentration von 1,0 µg/g zeigte nur der Katalasetest positiven Ausfall. Geringere Mengen wurden nicht mehr nachgewiesen. Für die relativ geringe Empfindlichkeit vor allem der Diffusionstests ist keine Erklärung zu finden.

Zumindest Aureomycin und Penicillin ließen sich mit allen vier Tests in Konzentrationen von 10,0 und 1,0 µg/g bzw. E/g nachweisen. Niedere Werte konnten mit den Diffusionsverfahren nicht mehr festgestellt werden. Der von van der Mijll Dekker und Mossel (50) angegebene Grenzwert ihres Diffusionstests für Aureomycin von 0,5 µg wurde allerdings nicht geprüft, da die Antibiotikum-Verdünnung bei den Vorversuchen in Zehnerpotenz vorgenommen wurde. Die schwachen Hemmhöfe von 2 mm lassen aber vermuten, daß eine kleinere Menge als 1,0 µg/g nicht mehr mit Sicherheit nachzuweisen ist. Das gleiche gilt auch für den Agardiffusionstest, obwohl auch hier ein Nachweiswert von 0,1 µg/g angegeben worden war (33).

Günstigere Ergebnisse lieferte der TTC-Test. Hier waren noch Werte von 0,1 µg/g bzw. E/g zu ermitteln. In je einem Fall ergaben Aureomycin und Penicillin in der Konzentration von 0,01 µg/g bzw. E/g noch fragliche Hemmung.

Kotter, Terplan und Schulz (42) fanden mit dem TTC-Test Penicillin in Bouillon noch bei 0,004 - 0,007 E/ml und Aureomycin noch bei 0,002 - 0,004 µg/g. Ein direkter Vergleich dieser Untersuchungsergebnisse mit den eigenen ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, da letztere auf g Nierenbrei bezogen sind, der dann noch mit 2 Teilen Peptonwasser "verdünnt" wurde. Die eigenen Ergebnisse müßten also durch 3 dividiert werden, um vergleichbare Voraussetzungen zu haben. Unter diesem Gesichtspunkt sind die Differenzen zwischen den Grenzwerten der Hemmwirkung von Antibiotika, die in Bouillon gelöst wurden, und von solchen, die dem Nierenbrei zugesetzt wurden, nicht erheblich.

Mit dem Katalasetest konnten Hemmwerte gefunden werden, die für Aureomycin unter 1,0 µg/g, aber über 0,1 µg/g und für Penicillin bei 0,01 E/g lagen. Der niedrige Penicillingrenzwert (Tab. 6) muß allerdings unter der Voraussetzung gesehen werden, daß auch der hemmstofffreie Nierenbrei schon eine relativ starke Eigenhemmung von 64% aufwies, so daß eventuell schon unterschwellige Konzentrationen genügt haben, um einwandfreie Hemmung, in diesem Fall 71%, bei 0,01 E/g zu bewirken. Daraus ist zu ent-

nehmen, daß Hemmstoffkonzentrationen, die im Katalasetest normalerweise nur fragliche Hemmung hervorrufen würden, bei starker Eigenhemmung der Niere sogar als positive Hemmstofftests in Erscheinung treten, wodurch allerdings der Wert des Tests nicht eingeschränkt ist.

Im Vergleich mit dem TTC- und dem Katalasetest zeigten beide Diffusionstests geringere Empfindlichkeit und längere Dauer. Die bis zum Ablesen des Ergebnisses erforderliche Zeit war mehr als doppelt so lang wie die der beiden anderen Tests. Die Durchführung der Plattendiffusionstests wäre allerdings für einen Routinetest einfacher und mit weniger Aufwand möglich als die des TTC- und des Katalasetests. Hierbei wäre dem Diffusionstest unter Verwendung eines Nierenstückchens der Vorzug zu geben gegenüber der Blättchenmethode, da ersterer immer etwas größere Hemmhöfe aufwies.

Der TTC-Test hat gegenüber dem Katalasetest den Vorteil, daß er einfacher und schneller zu handhaben und daher als Routinetest geeigneter ist als der Katalasetest in der gegenwärtigen Ausführung, obwohl die Ergebnisse des Katalasetests durch ihre prozentualen Angaben der Hemmung besser zu objektivieren sind.

Die Versuche an lebenden Tieren konnten aus technischen und finanziellen Gründen nur an Schweinen vorgenommen werden, so daß ihre Aussage in diesem Sinne einzuschränken ist. - Außerdem wurden alle Tierversuche nur mit Penicillin (Aquacillin "Bayer") durchgeführt, da dieses bei Schweinen das am häufigsten benutzte Antibiotikum ist und da bei der zur Verfügung stehenden Anzahl von Tieren weitere Antibiotika gar nicht mehr geprüft werden konnten.

Aquacillin "Bayer" ist ein Gemisch von kristallisiertem Procain-Penicillin G und gepuffertem Penicillin-G-Kalium im Verhältnis 3 : 1. Laut Prospekt erzeugt Aquacillin bei intramuskulärer Injektion sehr rasch einen weit über den allgemein erforderlichen Wert hinausgehenden Penicillin-Spiegel in Blut und Gewebsflüssigkeit und sichert infolge seines Gehaltes an Procain-Penicillin dessen Bestehen für 24 Std. und länger (Depotwirkung).

Die Untersuchungen erstreckten sich fast ausschließlich auf Nieren, da anhand der Literatur die Niere als Antibiotikum-Ausscheidungsorgan zum Nachweis als besonders geeignet erschien und gleichzeitig ja auch die Niere zur bakteriologischen Fleischuntersuchung eingeschickt werden muß.

Insbesondere sollte auch ermittelt werden, welche Zeit zwischen Injektion und Schlachtung liegen kann, um dieses Antibiotikum in der Niere noch zu erfassen und wie sich die Lagerungszeit während des Versands der Proben auswirkt. - Orientierende Untersuchungen an 7 Muskelproben hatten anfangs schon ergeben, daß die Hemmstofftests stets negativ waren, auch wenn die Nierenextrakte deutlich positive Tests zeigten. Von weiteren Untersuchungen der Muskulatur wurde daher abgesehen.

In der Literatur war die Abhängigkeit eines therapeutisch wirksamen Blutspiegels von applizierter Dosis, Applikationsart und Applikationshäufigkeit als gültig erkannt worden. Es wurde deshalb geprüft, ob Dosis und Ausscheidungszeit voneinander abhängen; aus diesem Grunde wurden verschieden hohe Dosen Penicillin gegeben und die Zeit zwischen Injektion und Schlachtung variiert.

Nach einer Einwirkungszeit von 24 Std. war Penicillin, das in einer Menge von 800 000 E und darüber injiziert worden war, in den Nieren der Versuchstiere mit allen vier Tests deutlich positiv nachweisbar; bei einer Dosis von 500 000 E wurde bei einem Tier ein fragliches, bei einem anderen ein negatives Ergebnis gefunden. Nach einer Einwirkungszeit von 48 Std. waren die Ergebnisse bei gesunden Schweinen, unabhängig von der injizierten Menge, bei allen vier geprüften Methoden negativ. Lediglich bei zwei kranken Schweinen aus demselben Bestand, bei denen der Stoffwechsel durch hochgradige Rachitis des einen und weniger deutliche Rachitis des anderen Tieres herabgesetzt und dadurch möglicherweise auch die Antibiotikum-Ausscheidung verzögert war, konnte eine Hemmung auch noch nach 48 Std. festgestellt werden, und zwar zeigten auch hier der TTC- und der Katalasetest höhere Empfindlichkeit als die Diffusionstests. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, gleiche Versuche bei kranken Versuchstieren (Rotlauf, Grippe, Futterschäden, Mangelerscheinungen und dgl.) vorzunehmen und die Ergebnisse mit denen von gesunden Tieren zu vergleichen. Dadurch könnten sich hinsichtlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung ganz andere Rückschlüsse ergeben, als sie jetzt auf Grund dieser Versuche mit gesunden Tieren möglich sind.

Der Katalasetest reagierte noch fraglich bei 9 von 12 Tieren, denen Penicillin 48 bzw. 72 Std. vor der Schlachtung injiziert wurde.

Das Lebendgewicht der Schlachttiere hatte auf den Testausfall wohl deshalb keinen Einfluß, weil die Gewichte nur unwesentlich voneinander abwichen.

Die Ergebnisse der nach 24 Std. Lagerung getesteten zweiten Nieren unterschieden sich kaum von den Testergebnissen bei den Nieren, die sofort nach der Schlachtung der Versuchstiere untersucht wurden. Die mit dem Katalasetest ermittelten Hemmungen lagen, wenn die erste Niere deutlich positiv war, nur minimal unter diesen Werten, hingegen waren die Unterschiede größer, sofern schon bei der ersten Niere fragliche Werte zu beobachten waren. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Inaktivierung des Antibiotikums während der Lagerzeit bzw. Versandzeit nicht erheblich ist, wenn der Gewebsspiegel hoch war.

Die Aussagen aus den Vorversuchen über die Empfindlichkeit der einzelnen Methoden gelten auch für die Tierversuche.

Aus den Tierversuchen lassen sich auch hinsichtlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung Schlüsse ziehen, die aber nur für Schweine und nur für Behandlungen mit einem Depot-Penicillin gelten. Starke Hemmstoffkonzentrationen sind im allgemeinen nur nach der Applikation von mehr als 500 000 E Penicillin zu erwarten und auch nur dann, wenn die Tiere innerhalb von 24 Std. nach der Injektion geschlachtet werden. Es muß aber berücksichtigt werden, daß die im Test nachgewiesenen Hemmstoffe im Nierengewebe in einer etwa 3fach stärkeren Konzentration vorliegen, da bei der Extraktion mit Peptonwasser eine entsprechende Verdünnung erfolgt. Immerhin sind damit Rückschlüsse auf Mindestkonzentrationen in der Niere und indirekt auch auf den Blut- und die sonstigen Gewebsspiegel möglich. Es ist ferner mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß bei positivem Ausfall der Tests in den Extrakten der Gewebsspiegel so hoch ist, daß im Gewebe befindliche Keime - sofern sie eine ähnliche Sensibilität wie die Testkeime haben - mit Sicherheit vollständig gehemmt werden. Dies gilt nicht für gegen das entsprechende Antibiotikum unempfindliche Keime. So könnte bei penicillinbehandelten Schweinen auch bei positivem Hemmstofftest nicht auf eine Beeinflussung von Salmonellen geschlossen werden, während Rotlauf- und Milzbranderreger vermutlich gehemmt oder abgetötet werden (75).

Die Feststellung, daß bei Schweinen, die später als 24 Std. nach der Injektion geschlachtet wurden, im allgemeinen keine positiven Hemmstofftests zu erwarten sind, kann auf kranke Tiere nicht ohne weiteres übertragen werden, wie dies die eigenen Untersuchungen zeigten. So ist es durchaus denkbar, daß auch bei infektiös erkrankten Tieren die Ausscheidung der Antibiotika verzögert erfolgt. Trotzdem müßte auch das Gegenteil bedacht werden, da zumindest in bestimmten Stadien von Infektionskrankheiten Erhöhung der Stoffwechselvorgänge gegeben ist.

Die Notwendigkeit eines generell zur bakteriologischen Fleischuntersuchung durchgeführten Tests auf Hemmstoffe war in dieser Arbeit nicht unmittelbar zu prüfen, wenngleich auch einige Nieren von Tieren untersucht wurden, deren Organe zur bakteriologischen Fleischuntersuchung eingesandt worden waren. Hier war in einem Fall eine sehr starke Hemmung in allen Tests zu beobachten, bei der vermutlich auch pathogene Keime gehemmt gewesen waren.

Auch ließe sich höchstens die Notwendigkeit eines generell zur bakteriologischen Fleischuntersuchung durchzuführenden Tests auf Hemmstoffe vom Laboratorium aus in der Weise prüfen, daß hemmstoffpositive Organe auch gegen die verschiedenen, am meisten in derartigen Proben ermittelten pathogenen Keime getestet würden.

Die Frage, welcher der vier untersuchten Tests zum unspezifischen Nachweis von Hemmstoffen empfohlen werden kann, ist aus den eigenen Ergebnissen dahingehend zu beantworten, daß der TTC-Test am ehesten die Bedingungen erfüllt, die an einen Routineschnelltest zu stellen sind, obwohl er nicht so objektivierbare Ergebnisse liefert wie der Katalasetest. Sofern letzterer noch eine Vereinfachung und vielleicht auch noch dazu die Ausschaltung gewisser imponderabler Streuungen zuläßt, könnte ihm vermehrte Bedeutung zukommen. Es bleibt jedoch auch noch zu überlegen, ob die Diffusionstests nicht dort eingesetzt werden sollten, wo die Dauer des Tests nicht ins Gewicht fällt, da mit diesen Methoden gleichzeitig mehrere Testkeime angewandt werden könnten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Schweinenierenbrei, dem vier gebräuchliche Antibiotika (Chloramphenicol, Streptomycin, Aureomycin und Penicillin) zugesetzt waren, wurde mit vier verschiedenen unspezifischen Hemmstofftests (2 Agardiffusionstests, TTC- und Katalasetest) untersucht. Aureomycin und Penicillin konnten mit allen vier Methoden, Streptomycin und Chloramphenicol nur mit TTC-Test und Katalasetest ermittelt werden.

2. Die gleichen Tests wurden bei Nieren von 19 Schweinen durchgeführt, denen in verschiedenen Zeitabständen vor der Schlachtung verschieden hohe Dosen von Penicillin intramuskulär appliziert worden waren. Von jedem Tier wurde eine Niere unmittelbar nach der Schlachtung, die andere nach 24 Std. Lagerung unter Versandbedingungen untersucht.

3. Die empfindlichen Testmethoden verliefen bei den Nieren von gesunden Schweinen dann positiv, wenn diese über 500 000 E Penicillin erhalten hatten und 24 Std. nach der Injektion geschlachtet worden waren.

4. Bei den Nieren von 2 kranken Schweinen war der Hemmstofftest positiv, obwohl beide Tiere erst 48 Std. nach der Injektion geschlachtet worden waren.

5. Zwischen den zuerst unter Versandbedingungen 24 Std. gelagerten und den sofort untersuchten Nieren waren nur unwesentliche Unterschiede festzustellen.

6. Von den vier Testmethoden erwies sich der TTC-Test als Routineschnelltest am vorteilhaftesten, da er in seiner einfachen Handhabung dem gleichempfindlichen Katalasetest überlegen ist. Letzterem könnte nach Vereinfachung der Vorzug gegeben werden, da er besser objektivierbare Ergebnisse liefert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Brüggemann, J. und M. Merkenschlager: Verbleib von Antibiotika im Tierkörper nach Fütterung und Schlachtung. Arch. Lebensmittelhyg. 9 (1958), 197.

2. Camy: Antibiotiques et inspection des viandes. Bull. Acad. Vét. 29 (1956), 459.

3. Clarenburg, A. und E. H. Kampelmacher: Die Bedeutung von Antibiotika für die bakteriologische Fleischbeschau mit besonderer Berücksichtigung der Milzbrand- und Salmonella-Diagnostik. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70 (1957), 203.

4. Coretti, K.: Versuche über eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Konservierungsmitteln in Fleischwaren. Jahresbericht 1955, Bundesforschungsanst. f. Fleischwirtsch., Kulmbach.

5. Deatherage, F. E.: Use of antibiotics in the preservation of meats and other food products. Am. J. of Publ. Health and the Nat. Health 47 (1957), 594.

6. 62. Deutscher Ärztetag: Stellungnahme des wissenschaftlichen Beirats der Bundesärztekammer. Med. Klinik 31 (1959), 1407.

7. Dold, H.: Zbl. f. Bakt. I, 2/4 (1950), 106; zit. nach Steinmetzer (66).

8. English, P. B.: Chloromycetinspiegel im Blut, Urin und in den Geweben bei Pferden. Bibliothek Parke Davis, München, Abschrift ohne Quellenangabe.

9. Foltin, H. W.: Zur Frage des Salmonellanachweises bei der bakteriologischen Fleischbeschau nach der Antibioticabeifütterung bzw. -therapie. Vet. med. Diss. München 1959.

10. Freerksen, E.: Bedeutung der Antibiotikafütterung und Lebensmittelfrischhaltung mit Antibiotika für den Menschen. Vortrag, gehalten auf dem intern. Sympos. Wien, Nov. 1956. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

11. Gellert, R.: Salomonellosis kunzendorf bei Läuferschweinen, behandelt mit Aureomycin-Supplement. Tierärztl. Umschau 11 (1956), 181.

12. Gillissen, G. und E. Becher: Die Reduktion von 2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Methode zur antibakteriellen Wertigkeitsbestimmung. Arch. f. Hyg. 141 (1957), 403.

13. v. Gils: Der Einfluß der Verwendung von Viehfutter mit Antibioticis auf die Fleischbeschau. Tijdschrift voor Diergeneeskunde 82 (1957), 808.

14. Gratzl, E. und W. Jaksch: Der Penicillinblutspiegel bei Pferd, Rind und Hund. Wien. Tierärztl. Mschr. 39 (1952), 144, 225.

15. Gratzl, E. und W. Jaksch: Aureomycinblutspiegel-Bestimmungen bei Pferd, Rind und Hund. Wien. Tierärztl. Mschr. 41 (1954), 73.

16. Gratzl, E. und W. Jaksch: Terramycinblutspiegel bei Pferd, Rind und Hund. Wien. Tierärztl. Mschr. 40 (1953), 643.

17. Gratzl, E. und R. Szumlakowski: Streptomycin-Blutserumspiegelbestimmung bei Pferd, Rind und Hund sowie zwei Verfahren zur Spiegelverlängerung. Wien. Tierärztl. Mschr. 40 (1953), 547.

18. Grau, R.: Sitzungsbericht über die Versammlung des Verbandes Deutscher Agrarjournalisten e. V., Landesgruppe Schleswig-Holstein. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 108 (1958), 294.

19. Grau, R.: Untersuchungen mit Aureomycin in der Fleischbeschau. Vortrag, gehalten auf dem intern. Sympos. Wien, Nov. 1956. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

20. Henneberg, O. H.: Antibiotikakonservierung - Hygiene der Schlachtung und der Erzeugung von Fleischwaren. Wien. Tierärztl. Mschr. 12 (1958), 755.

21. Henneberg, O. H. und H. Habelt: Versuche über die Verlängerung der Haltbarkeit von Rindfleisch mit Tetracyclin. Wien. Tierärztl. Mschr. 45 (1958), 473.

22. Herrell, W. E. und F. R. Heilmann: zit. nach Vonderbank (74), Aureomycin und Achromycin Editio Cantor / Aulendorf i. Württ. 1956.

23 Herter, R.: Zur Ausführung und Auswertung der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Lebensmitteltierarzt 4 (1953), 245.

24. Hirsch, H. L. und L. E. Putman: Penicillin. Antibiotics Monographs Bd. 9 (1958). Verlag Medical Encyclopedia Inc. New. York, N. Y.

25. Hock, A.: Einfluß der Antibiotika auf das Wachstum (Sammelreferat). Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66 (1959), 48, 102.

26. Holz, C.: Diskussionsbeitrag. Mitt. GDCh-Fachgr. Lebensmittelchemie 12 (1958), 89.

27. Internationales Symposion, 15. - 17. Nov. 1956, Wien: Die Bedeutung der Antibiotika in der Tierernährung und Lebensmittelhygiene unter besonderer Berücksichtigung von Aureomycin. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

28. Jahn, W.: Über das Auftreten resistenter Infektionserreger nach der Anwendung von Antibioticis. Tierärztl. Umschau 11 (1956), 164.

29. Janke, A., R. G. Janke, K. Bauer, H. Heilmann, H. Kirchmeyer und W. G. Kostjak: Über die Erhöhung der Haltbarkeit geschlachteter Hühner durch Behandlung mit Chlortetracyclin. Zbl. f. Bakt. Abt. II, 111 (1958), 291.

30. Jay, J. M., H. H. Weiser und F. E. Deatherage: The effect of chlortetracycline on the microflora of beef, and studies on the mode of action of this antibiotic in meat preservation. Antib. Annual. 1956/57, 954.

31. Kalich, J. und M. Merkenschlager: Zur Frage des Salmonellanachweises in Organen nach Antibiotika-Therapie bzw. Beifütterung. Tierärztl. Umschau 13 (1958), 324.

32. Kelch, L.: Neue Erkenntnisse und Probleme der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 11 (1957), 354.

33. Kelch, L. und K. Coretti: Zum Nachweis von Aureomycin in Fleisch- und Organproben von Schlachttieren. Fleischwirtschaft 11 (1959), 358.

34. Killian, H.: Depot-Penicillin, Penicillin-Blutspiegel, Gesetze der Penicillin-Verteilung und Penicillin-Bilanz. Arzneimittelforschung 1 (1951), 107.

35. Kissling, R.: Über den biologischen Nachweis von Antibiotika aus Geweben. Wien. Tierärztl. Mschr. 46 (1959), 466.

36. Klein, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1957.

37. Kline, E.F., A. Abbey, M. A. Darken, M. C. Firman, A. R. Kohler, W. H. Miller, W. W. Wiley, H. Windlau und S. D. Upham: Improved quality of fish filets as a result of a food grade of chlortetracycline. Antib. Annual. 1956/57, 997.

38. Kluyver, A. J.: Biochemische Siukerbepalingen. Diss. Univ. Delft 1914, 129; zit. nach Mossel (51).

39. Kohler, A. R., W. H. Miller und H. P. Broquist: Aureomycin Chlortetracycline and the control of poultry spoilage. Food Techn. 2 (1955), 151.

40. Kotter, L.: Einschaltung eines biologischen Hemmstofftestes bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 12 (1960), 188.

41. Kotter, L.: Diskussionsbeitrag gelegentlich der Tagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" der Dt. Vet. Med. Ges. am 21. 10. 1958 in Bad Pyrmont; zit. nach Kotter (40).

42. Kotter, L., G. Terplan und H. Schulz: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1959), 145.

43. Kreuzer, R.: Die Verwendung von Aureomycin (Acronize) zur Frischhaltung von Seefischen. Vortrag, gehalten auf dem intern. Sympos. Wien, Nov. 1956. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

44. Lerke, P. A. und L. Farber: Prolongation of the keeping quality of fish and shelfish by antibiotics. Antib. Annual. 1956/57, 966.

45. Lienert, E. und F. Zöchmann: Penicillin-Serumspiegelbestimmung beim Hund nach parenteraler Applikation von Natrium bicarbonicum und wässriger Penicillinlösung bzw. schwerlöslicher Penicillinverbindung. Wien. Tierärztl. Mschr. 40 (1953), 598.

46. Lochmann, E. H.: Kann das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung durch zur Zeit des Todes im Organismus befindliches Penicillin beeinflußt werden? Arch. Lebensmittelhyg. 21/22 (1955), 251.

47. Lorenz, W.: Die Verfütterung von Aurofac vom Standpunkt der Lebensmittelkontrolle. Vortrag, gehalten auf dem intern. Sympos. Wien, Nov. 1956. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

48. Maier, K.: Aureomycinspiegel in Blut, Harn und Milch beim Schwein. Vet. med. Diss. Wien 1954.

49. Meyn, A., J. Kalich und M. Merkenschlager: Der Einfluß der Antibiotika-Beifütterung und der Antibiotika-Therapie auf das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 73 (1960), 81.

50. van der Mijll Dekker, L. P., D. A. A. Mossel, A. S. de Bruin und A. Manten: The presumptive detection of some antibiotics in foods, using a simple microbiological test. J. Sci. Food Agric. 9 (1959), 475.

51. Mossel, D. A. A.: The Kluyver fermentation test for detecting preservatives in foods. Food Manufacture 31 (1956), 190.

52. Mossel, D. A. A.: The aspecific detection of preservatives in foods by a simple fermentation test with special reference to cured meat products. Analyst 79 (1954), 443.

53. Mossel, D. A. A., J. G. Mandersloot und A. S. S. Gentis: A simplified microbiological test for the detection of preservatives in milk and milk products. Neth. Milk. Dairy J. 9 (1955), 63.

54. Müller: Antibiotika in der Landwirtschaft. Nachr. aus Chem. u. Technik 5 (1957), 235.

55. Nagel, V.: Zur Frage der Desinfektion und Konservierung roher Milch mit Streptomycin. Ärztl. Wschr. 5 (1950), 393.

56. Neal, C. E. und H. E. Calbert: Detection of lactic starter inhibitors using 2-, 3-, 5-Triphenyltetrazoliumchloride. Milk Products J. 47 (1956), 3, 14.

57. Neal, C. E. und H. E. Calbert: Incidence of lactic starter inhibitory substances in individual herd milks of Wisconsin. Milk Products J. 47 (1956), 6, 18.

58. Nitschke, E. und D. Strauch: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der unter Einwirkung von Penicillin gezüchteten Brucella militensis. Berl. Münch. Wschr. 70 (1957), 284.

59. Nolte, A.: Die Anwendung der Antibiotika, insbesondere des Penicillins in der tierärztlichen Praxis. Tierärztl. Umschau 6 (1951), 435.

60. Partmann, W.: Antibiotika in der Lebensmittelfrischhaltung. Vortrag, gehalten auf dem intern. Sympos. Wien, Nov. 1956. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

61. Pratt, R. und J. Dufrenoy: Stain technol 23 (1948), 137; zit. nach Kohler et al. (39).

62. Petuely, F. und G. Lindner: Untersuchungen über die Regulationsmechanismen für die Darmflora und ihre Beeinflussung durch Terramycin. Bedeutung des bakteriologischen Umgehungsmilieus für die Darmflora. Zbl. f. Bakt. I, O, 169 (1957), 178.

63. Pschyrembel: Klin. Wörterbuch 117. - 122. Aufl. 1958.

64. Schermer, J.: Untersuchungen über die Verweildauer des Penicillins im Tierkörper bei verschiedenen Lösungsmitteln. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 56 (1949), 250.

65. Sompolinski, D.: Influence of Penicillin therapy on bacteriological diagnostics. Nord. Vet. Med. 1 (1949), 442.

66. Steinmetzer, K.: Pharmakologie für Tierärzte einschließlich Verordnungslehre. Verlag Urban & Schwarzenberg 1955.

67. Tarr, H. L. A.: Chemical inhibition of growth of fish spoilage bacteria. J. Fish. Res. Bd. Canada, 6 (1944), 257.

68. Tarr, H. L. A., J. W. Boyd und H. M. Bissett: Antibiotics in food processing, experimental preservation of fish and beef with antibiotics. J. Agric. Food Chem. 2 (1954), 372.

69. Tarr, H. L. A., B. A. Southcott und H. M. Bissett: Experimental preservation of fresh foods with antibiotics. Food Technol. 6 (1952), 363.

70. Terplan, G.: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Fleischkonserven. Arch. Lebensmittelhyg. 11 (1960), 2.

71. Torsten, A.: Studies on the distribution of tritium-labelled Dihydrostreptomycin and Tetracycline on the body. Nord. Vet. Med. 9 (1957), 220.

72. Vogel, H.: Die Antibiotika. Grundzüge der Chemie und Physiologie der mikrobiellen Hemmstoffe. Verlag Hans Karl, Nürnberg 1951.

73. Vogel, H.: Antibiotika in der Haustierfütterung. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ. 1957.

74. Vonderbank, H.: Aureomycin und Achromycin. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ. 1956.

75. Walter, A. M. und L. Heilmeyer: Antibiotikafibel - Indikation und Anwendung der Chemotherapeutika und Antibiotika. Verlag G. Thieme, Stuttgart 1954.

76. Weinstein, L. und N. J. Ehrenkranz: Streptomycin und Dihydrostreptomycin. Antib. Monographs 8 (1958); Verlag Medical Encyclopedia Inc. New York, N. Y.

77. Weiser, H. H., H. S. Goldberg, V. R. Cahill, L. E. Kunkle und F. E. Deatherage: Observations on fresh meat processed by the infusion of antibiotics. Food. Technol. 7 (1953), 495.

78. White-Stevens, R. H.: Die Anwendung von Aureomycin zur Verlängerung der Haltbarmachung von Geflügel, Fleisch und Fisch. Vortrag, gehalten auf dem intern. Sympos. Wien, Nov. 1956. Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

79. Woodward, Th. E. und Ch. L. Wisseman: Chloromycetin. Antib. Monographs 10 (1958); Verlag Medical Encyclopedia Inc. New York, N. Y.

80. Wrenshall, C. L.: Advances in food technology made possible through the use of antibiotics. Antib. Annual. 1956/57, 809.

Herrn Prof. Dr. L. Kotter, dem Vorstand des Instituts für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, möchte ich für die Überlassung des Themas meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Terplan für zahlreiche Anregungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 9. Mai 1933 wurde ich, Horst Heinrich Conrad Piening, als Sohn des prakt. Arztes Dr. med. Conrad Piening und seiner Ehefrau Fridel Piening, geb. Riepen, in Neumünster, Schleswig-Holstein, geboren.

Dort besuchte ich Volks- und Oberschule ("Holstenschule"); im Februar 1955 bestand ich das Abitur.

Im Mai desselben Jahres begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich im Mai 1960 mit der Tierärztlichen Prüfung abschloß.

Am 15. Juli 1961 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.